

· 论 著 ·

[文章编号] 1000-8861(2011)01-0070-03

抗人死亡受体 5 单链抗体特性分析

程小峰, 张佳锴, 孟庆宇, 黄小平, 范鑫, 庄国洪*

[摘要] 目的 探究抗人死亡受体 5 (DR5) 单链抗体 (aDR5ScFv) 的特异性。方法 ELISA 检测 aDR5ScFv 的效价、亲和力和表位分析。Western blotting 检测单链抗体的特异性。MTT 检测 aDR5ScFv 对结肠癌细胞 SW480 的生长抑制。结果 ELISA 显示抗人死亡受体 5 单链抗体抗体效价为 1.2×10^4 。通过间接 ELISA 证实 aDR5ScFv 与 aDR5mAb 识别 DR5 胞外段 (eDR5, 系本实验室自己构建) 的同一个位点。aDR5ScFv 的亲和力常数为 2.12×10^{-2} 。eDR5 与 aDR5ScFv 能够特异结合。MTT 检测结果显示, aDR5ScFv 抑制 SW480 细胞生长呈剂量依赖性, aDR5ScFv 终质量浓度分别为 0.225 mg/ml、0.45 mg/ml、0.9 mg/ml、1.2 mg/ml。200 μ l 时, SW480 细胞的存活率分别为 97.7%、70.9%、70.1%、23.6%。结论 aDR5ScFv 能与 eDR5 特异性结合, 并具有较强的活性。

[关键词] DR5; 单链抗体; 特异性; SW480**[中图分类号]** R392.11**[文献标识码]** A

Characterization of single chain antibody against DR5

CHENG Xiaofeng, ZHANG Jiakai, MENG Qingyu, HUANG Xiaoping, FAN Xin, ZHUANG Guohong

Anti-Cancer Center, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] The aim of our study is to characterize the property of aDR5ScFv. We employed ELISA to determine the titer, relative affinity and epitope recognition of aDR5ScFv, while Western blotting to analyze the specificity of aDR5ScFv. We also measured the inhibitory effects of aDR5ScFv on colon cancer cell SW480 growth by MTT. We found that the titer of aDR5ScFv was 1.2×10^4 ; aDR5ScFv and aDR5mAb recognized the same epitope on DR5 molecule; and the affinity constant of aDR5ScFv was 2.12×10^{-2} . Furthermore, aDR5ScFv could recognize eDR5 specifically and inhibit the growth of SW480 cells in a dose-dependent manner (aDR5ScFv final concentrations of 0.225, 0.45, 0.9, 1.2 mg/ml correspond to SW480 viabilities of 97.7%, 70.9%, 70.1%, 23.6%). Western blotting showed the binding of aDR5ScFv to DR5 was specific. Thus, we concluded that binding of aDR5ScFv to DR5 is specific and aDR5ScFv had strong activity.

[Key words] DR5; ScFv; Specificity; SW480

死亡受体 5 (death receptor 5, DR5) 是 TRAIL 受体之一, 属于肿瘤坏死因子受体超家族成员, Pan 等^[1]学者于 1997 年发现其构型由 411 个氨基酸组成, 其与相关配体结合能选择性地杀伤多种肿瘤细胞, 而对正常细胞没有毒性, TRAIL 是最先发现的 DR5 配体, 随后发现不同形式的 TRAIL 对正常人的不同细胞有毒性, 特别是肝细胞的凋亡显得尤为突出^[2]。Ichikawa 等^[3]研制出 TRA-8, 针对人 DR5 受体的特异性单克隆抗体, 研究发现其不仅杀瘤效应比 TRAIL 强出数倍, 而且对正常人的肝细胞及其他细胞均没有毒副作用。

目前现有的研究证实, 抗 DR5 单克隆抗体 (mAb) 可通过与 DR5 的特异性结合, 诱导表达 DR5 的肿瘤细胞凋亡。其机制是其作用机制为激活起始因子胱冬酶原 (caspase-8) 后, 通过线粒体途径和非线粒体途径及一系列的级联效应, 最终激活效应酶 (如 caspase-3、caspase-7 等), 从而介导细胞的凋亡。但同时也有报道证明抗 DR5 单克隆抗体亦存在肝毒性^[4-5]。目前制备的抗 DR5 单克隆抗体多数属于鼠源性, 直接作用人体会产生机体排斥反应, 降低治疗效果。

本实验室已制备出抗人 DR5 单克隆抗体, 并证实其能明显的诱导肿瘤细胞凋亡且无肝毒性^[6]。我们对该抗体进行了改造。钓取该抗体轻、重链可变区基因, 构建单链抗体表达载体, 并表达单链抗体蛋白, 以下简称 aDR5ScFv。本实验对其特性进行分析, 为

基金项目: 福建省自然科学基金 (C0710046)

作者单位: 361005, 厦门大学抗癌研究中心

* 通信作者: 庄国洪, Tel: 0592-2180587; E-mail: zhuanguohong@yahoocom.cn

进一步研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 抗人 DR5 单链抗体 aDR5ScFv, 由本实验室制备。SW480 结肠癌细胞株由厦门大学抗癌研究中心保存。四氮唑蓝(MTT), 购自 Sigma 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 及包被条, 购于厦门波生生物工程有限公司。碳酸盐包板液、ELISA 封闭液、PBS 洗板液、TMB 显色液、结合缓冲液及洗脱液等均自行配制。SDS-PAGE 及转膜仪器均来 BIO-RED。ECL 显色液为厦门鹭隆公司。Model 3550 酶标仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 效价分析 利用间接 ELISA 测定, 分别以不同浓度的 eDR5 包被酶标板, 酶标单链抗体倍比稀释。选择 450 nm 波长测定 A 值。以单克隆抗体为阳性对照, 以 PBS 为阴性对照。

1.3 相对亲和力分析 首先确定 DR5 抗原的最适包被量, 绘制用 4 个浓度 (5、2.5、1.25、0.625 mg/L) 的 DR5 包被时, aDR5ScFv 的稀释度与 $A_{450\text{nm}}$ 的关系图, 分别求出其最大 A 值一半 (即 $A_{50\%}$) 处对应的抗体浓度。按公式 $K_{\text{aff}} = (n-1) / 2 (nAb' - Ab)$ 计算亲和常数。

1.4 表位竞争分析 即用 2 mg/L 的 eDR5 包被 96 孔板, 分别加入 aDR5ScFv 和 aDR5mAb 各加 100 μl /孔, 倍比稀释。用 PBS 作阴性对照 100 μl /孔。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。洗板, HRP 标记的兔抗鼠 IgG, 同上孵育及洗板后, 加底物 OPD 溶液, 于波长 450 nm 测定 A 值。按公式 $[(2A_{1+2} / (A_1 + A_2)) - 1] \times 100\%$ 计算相加指数 (AI)。 A_{1+2} 为两种抗体混合后的 A 值; A_1 、 A_2 为 1 种抗体的 A 值, 当 AI > 50% 时, 即认为是与不同表位的结合。

1.5 Western blot 检测 原核表达 eDR5, 进行 SDS-PAGE 变性电泳, 分离胶浓度为 10%。电泳后转膜, 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h, 酶标 aDR5ScFv 为一抗, 1:1 000 稀释于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗膜 3 次, 每次 5 min。然后 ECL 显色, 凝胶成像系统拍摄。

1.6 细胞培养 SW480 细胞用含 10% 小牛血清及青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 隔日传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.7 MTT 法检测 取对数生长期 SW480 细胞, 调整细胞数至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 按每孔 2×10^5 接种于 96 孔培养板, 培养 12 h, 细胞贴壁后, 吸去上清液。分组, 每组 3 个复孔, 分组为正常血清组 (浓度 10%), aDR5ScFv 组, aDR5mAb 组。分别培养 4 h 后加入 MTT (5 mg/ml) 20 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 h 后弃上清终止培养, 每孔

加入 DMSO 200 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 10 min, 在酶标仪 490 nm 处测各孔光吸收度 (OD), 计算各组细胞的生存率。生存率 = $1 - [(\text{对照组平均 OD}_{490\text{nm}} \text{ 值} - \text{实验组平均 OD}_{490\text{nm}} \text{ 值}) / \text{对照组平均 OD}_{490\text{nm}} \text{ 值}] \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 效价分析 间接 ELISA 测定即包被 eDR5, e-DR5 系本实验室自己构建, 为 DR5 胞外段, 通过倍比稀释酶标一抗, 检测抗体效价。最后检测得 aDR5ScFv 的效价为 1.2×10^4 。

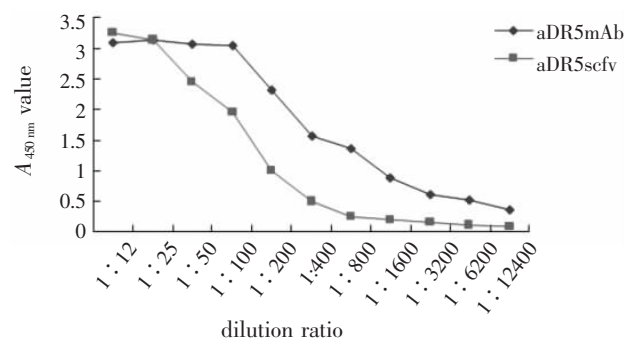


图 1 aDR5ScFv 和 aDR5mAb 的效价检测

Fig 1 The titers of aDR5ScFv and aDR5mAb

2.2 aDR5ScFv 亲和常数的测定 对亲和常数测定曲线进行模拟, 得到 4 个半数 A 值时的 aDR5mAb 和 aDR5ScFv 的浓度, 从图 2 中可以确定, 每孔包被 40、20、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 eDR5 时, A 值为最大 A 值的 50% 时的 aDR5ScFv 质量浓度依次为: 25、7、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

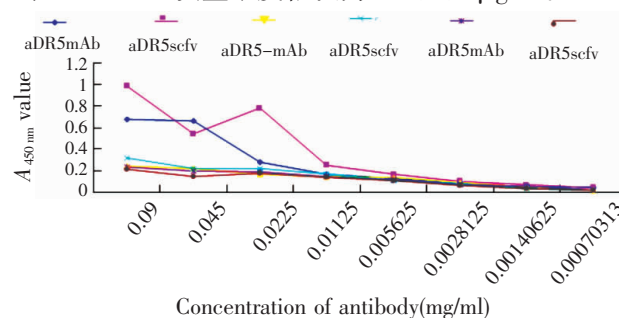


图 2 aDR5ScFv 和 aDR5mAb 与 eDR5 的亲和力曲线

Fig 2 The response curve of binding of aDR5ScFv and aDR5mAb to eDR5

2.3 表位分析 将 aDR5ScFv 和 aDR5mAb, 进行抗体相加试验, 并计算相加指数。结果表明, aDR5ScFv 和 aDR5mAb 可识别同一种抗原表位。且竞争作用随 scFv 抗体量的增加而增强 (图 3)。

2.4 Western blot Western blot 检测结果证实, eDR5 与 aDR5ScFv 能够结合, eDR5 系本实验室自己构建, 为 DR5 胞外段。eDR5 片段大小为 17 000, 与目标条带位置相同, 证实两者能够结合。另一泳道用 PBS 作阴性对照 (图 4)。

2.5 MTT 法检测 aDR5ScFv 对 SW480 的细胞毒性效应

aDR5ScFv 对 SW480 细胞有杀伤作用,并随着 aDR5ScFv 剂量的增加,SW480 细胞生长抑制率也随之增加,呈明显的剂量相关性。当 200 μ l aDR5ScFv 终质量浓度为 0.0562 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 97.7%;200 μ l 终质量浓度为 0.1125 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 70.9%;200 μ l 终质量浓度为 0.225 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 70.1%;200 μ l 终质量浓度为 0.45 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 23.6%(图 5)。

3 讨论

本实验室制备的抗人死亡受体 5 单链抗体效价可达到 1.2×10^4 。通过间接 ELISA,确认其与

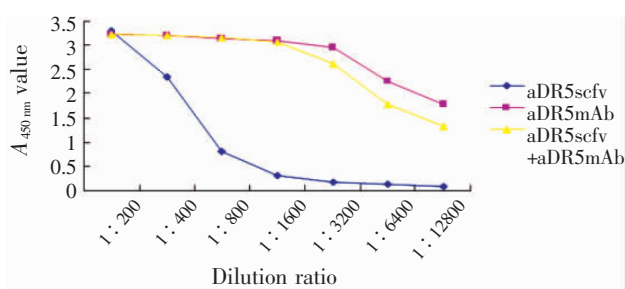
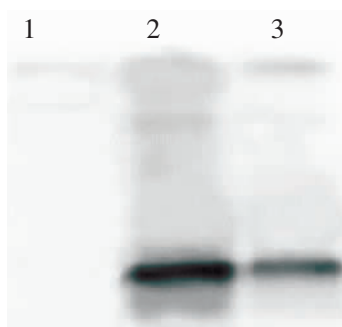


图 3 aDR5ScFv 的表位分析

Fig 3 Analysis of antigenic epitopes of aDR5ScFv



1) PBS; 2) aDR5mAb; 3) aDR5scfv.

图 4 aDR5ScFv 的 Western blot 检测鉴定

Fig 4 Identification of aDR5ScFv by Western blotting

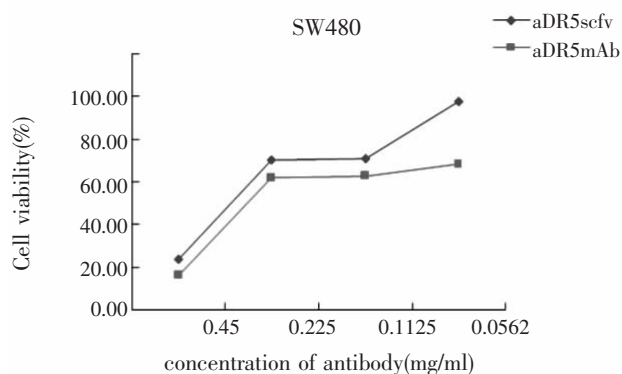


图 5 MTT 法检测 SW480 细胞存活率

Fig 5 SW480 viability measured by MTT

aDR5mAb 识别 eDR5 的同一个位点。且与 eDR5 有较强的结合能力,根据相对亲和力结果,每孔包被 40、20、10 μ g/ml 的 eDR5 时,A 值为最大 A 值的 50%时的 aDR5ScFv 浓度依次为 25、5、6 μ g/ml。

根据 Western blot 检测结果证实,eDR5 与 aDR5ScFv 能够特异结合。MTT 检测结果显示,aDR5ScFv 可以抑制 SW480 细胞生长,并且 aDR5ScFv 对细胞的生长抑制呈剂量依赖性,当 200 μ l aDR5ScFv 终质量浓度为 0.225 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 97.7%;200 μ l 终质量浓度为 0.45 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 70.9%;200 μ l 终质量浓度为 0.9 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 70.1%;200 μ l 终质量浓度为 1.2 mg/ml 时,SW480 细胞存活率为 23.6%。与 aDR5mAb 相比,其诱导凋亡能力稍弱。此抗体为本实验室通过 PCR 技术对抗 DR5 单克隆抗体进行改造,去除了鼠源性抗体的恒定区,钩取该抗体轻、重链可变区基因,构建单链抗体表达载体,并表达纯化单链抗体蛋白。其易于构建和表达、相对分子质量小、穿透力强、体内循环半衰期短、免疫原性低及排除了 Fc 段所致的免疫复合物反应^[7]。通过 Western blot 证实能够与 eDR5 抗原结合。并可以抑制多种肿瘤细胞生长(结果另见发表),为进一步对其功能及代谢研究奠定基础。

【参考文献】

- [1] Pan G, Ni J, Wei YF, et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL [J]. Science, 1997, 277 (5237): 815-818.
- [2] 白慧玲,裴景堂,杜耀武,等. 兔抗人 DR5 分子多克隆抗体的制备与初步应用 [J]. 免疫学杂志, 2008, 24 (6): 634-637.
- [3] Ichikawa K, Liu W, Zhao L, et al. Tumoricidal activity of a novel anti human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity [J]. Nat Med, 2001, 7 (8):954-960.
- [4] Frederick PJ, Kendrick JE, Straughn JM Jr, et al. Effect of TRA-8 anti-death receptor 5 antibody in combination with chemotherapy in an ex vivo human ovarian cancer model [J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19(5):814-819.
- [5] Yada A, Yazawa M, Ishida S, et al. A novel humanized anti-human death receptor 5 antibody CS-1008 induces apoptosis in tumor cells without toxicity in hepatocytes [J]. Ann Oncol, 2008, 19(6):1060-1067.
- [6] 杨东海,庄国洪,刘忠臣,等. 抗人 DR5 单克隆抗体的制备、鉴定及活性分析 [J]. 免疫学杂志, 2009, 25 (6):671-675.
- [7] 赵泽文,梁志清. 抗 rhEndoglin 单链抗体的可溶性表达、纯化及活性鉴定 [J]. 免疫学杂志, 2009, 25(1):56-60.

(收稿日期:2010-09-27;修回日期:2010-11-08)

(编辑 侯 瑞)